

УДК [(579.68:546.17):58.083](285.3)

Е.В. СТАРОСИЛА, Г.Н. ОЛЕЙНИК

Институт гидробиологии НАН Украины
пр-т Героев Сталинграда, 12, Киев 04210**МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КЛЕТКИ
БАКТЕРИОПЛАНКТОНА, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ *in situ* МЕТОДАМИ**

Исследовали метаболическую активность бактериопланктона водоемов дендропарка “Александрия” (м. Белая Церковь) и рыбных прудов Белоцерковской гидробиологической экспериментальной станции Института гидробиологии НАН Украины. Установлен процент клеток, которые содержат нуклеоид и реплицированную ДНК (готовых к делению), а также клеток с неповрежденной цитоплазматической мембраной (живых) и бактерий с активным транспортом электронов. Установлено, что концентрация минерального азота около 1 г N/дм³ влечет повреждение цитоплазматической мембраны клеток бактериопланктона.

Ключевые слова: клетки с нуклеоидом, клетки с реплицированным нуклеоидом, состояние цитоплазматической мембраны бактерий, бактерии с активным транспортом электронов, методы *in situ*

Разработка и введение в практику гидромикробиологических исследований прямых методов изучения сообществ микроорганизмов *in situ* позволили давать не только детальную характеристику морфологических свойств бактерий, но и изучить жизнеспособность и метаболизм на уровне клеток в естественных условиях местообитания.

На протяжении последней четверти века оценка бактерий как важного биологического компонента в водных экосистемах подвергалась изменениям. Стимулирование этого процесса происходило благодаря внедрению метода прямого подсчета микроорганизмов, оценкам бактериального обилия и активности бактериальных сообществ [7, 9]. Сегодня для того, чтобы понимать экологию микробиологических сообществ *in situ* необходима информация о принадлежности и активности индивидуальных клеток бактерий. Поэтому значительная часть достижений недавних исследований сфокусирована на развитии новых методов и подходов, которые позволяют оценить активность индивидуальной бактерии.

Метаболическую активность и физиологический статус бактерий до второй половины XX века изучали, выделяя штаммы бактерий на различные питательные среды. Посевы проб воды, перифитона и бентоса на жидкие и твердые лабораторные среды не позволяли культивировать значительную часть бактерий, что приводило к искажению получаемых данных не только о численности, биомассе, морфологии, но и о метаболизме микроорганизмов [2, 7, 9]. Выращивание микроорганизмов на питательных средах или добавление питательных субстратов к исследуемым пробам, а также высокий температурный режим часто приводят к изменениям метаболической активности бактериальных клеток по сравнению с их активностью *in situ* [5, 8]. До сих пор исследование активности бактерий остается значительной методологической проблемой. Поэтому полученные результаты при использовании единичных методов могут давать скорее относительную, чем абсолютную информацию. Для получения информации о физиологическом статусе индивидуальной клетки в бактериальном сообществе *in situ* и в лабораторных исследованиях сегодня в микробиологической экологии используют различные приборы, методы хранения и транспортирования проб, фиксаторы, специфические красители, полимеразные цепные реакции (ПЦР) и определенные стартеры. Для получения более полной оценки состояния микроорганизмов тестирование жизнеспособности индивидуальных клеток бактерий и их метаболической активности в морских, солоноватых и пресноводных экосистемах (вода, донные отложения и обрастания), а также вытяжках из почв, необходимо проводить при помощи комбинирования различных методов [2, 4, 5, 7–9].

Важными признаками экологического функционирования бактерий в экосистемах являются наряду с численностью, биомассой, морфологическими и размерными параметрами бактерий, также такие физиологические показатели как дыхательная деятельность бактерий,

состояние цитоплазматической мембраны, клетки с неповрежденным нуклеоид и находящиеся на стадии деления [2–5, 8, 9, 12].

В данной статье представлены результаты исследований метаболически активных индивидуальных клеток бактериопланктона (состояние цитоплазматической мембраны бактерий, клетки с активными центрами переноса электронов, содержащие нуклеоид и находящиеся на стадии деления) с использованием различных *in situ* методов в экстремально загрязненных неорганическим азотом водоемах.

Материал и методы исследований

Исследования проводили на водоемах, загрязненных неорганическим азотом, расположенных на территории парка «Александрия» (г. Белая Церковь), рыбоводных прудах Белоцерковской экспериментальной гидробиологической станции (БЭГС) Института гидробиологии и участке реки Рось в районе БЭГС. В подземных загрязненных водах в месте их поступления в пруд № 2 содержание аммонийного азота составляло 1200–1400 мг N/дм³. В пруду № 2 концентрация N_{неорг} колебалась в пределах 97,7–667,8 мг N/дм³. В нижней части следующего в каскаде паркового пруда № 3 содержание N_{неорг} находилось в пределах 54,0–74,4 мг N/дм³. Этот пруд является водоисточником для двух загрязненных «опытных» (№№ 21, 23) рыбоводных прудов БЭГС, поэтому концентрация неорганического азота в их воде была 24,4–60,8 мг N/дм³. В третьем «контрольном» (№ 30) рыбоводном пруду, снабжающемся водой из р. Рось, концентрация N_{неорг} не превышала 0,44 мг N/дм³ [1] (рис. 1).

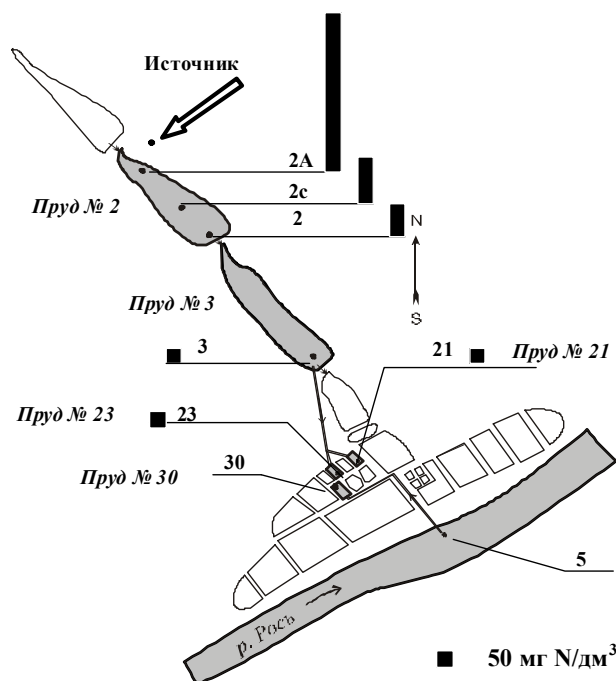


Рис. 1. Схема прудов, станции отбора проб и концентрация неорганического азота в воде [1]:

ст. 2А — 348,7–667,8 мг N/дм³; ст. 2с — 142,5–180,0 мг N/дм³; ст. 2 — 97,7–212,2 мг N/дм³; ст. 3 — 54,0–74,4 мг N/дм³; ст. 21 — 24,4–55,4 мг N/дм³; ст. 23 — 33,0–60,8 мг N/дм³; ст. 30 — до 0,44 мг N/дм³; ст. 5 — до 0,29 мг N/дм³.

Численность бактериопланктона, процент клеток с реплицированным нуклеоидом, состояние цитоплазматической мембраны бактерий и клетки с активными центрами переноса электронов определяли методом прямого микроскопирования, окрашивая препараты согласно с [7–10, 12]. Окрашенные препараты изучали при использовании эпифлуоресцентного микроскопа ВХ–41 (Olympus) и системы автоматического анализа изображения MultiScan [11].

Результаты исследований и их обсуждение

В зависимости от сезона и станции отбора проб клетки с нуклеоидом в бактериопланктоне составляли от 10% до 82% общего количества бактерий. Порядок значений, как и разброс данных, характерен для многих водных экосистем [3, 6, 8]. Установлено, что в парковых прудах содержание в бактериопланктоне клеток с нуклеоидом, было в 4 раза ниже, чем в рыбоводных «опытных» и «контрольном». Это обусловлено различным качественным

составом органического вещества, которое в парковых прудах представлено продуктами деструкции листового опада и малочисленных макрофитов, а в рыбоводных прудах — метаболитами фито-, зоо- планктона и рыб. При снижении содержания неорганического азота в бактериопланктоне отмечен прирост доли клеток с нуклеоидом, но между этими показателями не установлено четкой зависимости.

Доля клеток с реплицированным нуклеоидом (потенциально готовых к делению или делящихся клеток) составляла от 0,6% до 28,2% численности бактериопланктона и была значительно ниже, чем клеток с нуклеоидом. Это явление подтверждают и другие авторы [9]. Минимальное содержание клеток, находящихся на стадии деления, установлено в бактериопланктоне парковых прудов, характеризующихся редуцированной трофической цепью. А в бактериопланктоне рыбоводных прудов с интенсивным развитием зоопланктона их количество было в 5,2 раз выше. Активный пресс зоопланктона на бактериальное сообщество способствовал делению и ускорению темпа размножения индивидуальных клеток.

В бактериопланктоне клетки с неповрежденной цитоплазматической мембраной составляли от 7,0% до 64,5%. Зафиксировано повреждающее действие высокой концентрации неорганического азота на цитоплазматическую мембрану бактерий. Так, при содержании $N_{неорг}$ около 1 г N/дм³ клетки с неповрежденной мембраной в бактериопланктоне составляли только 7%. При концентрации неорганического азота в воде до 0,2 г N/дм³ доля таких клеток повышалась в 9,2 раза.

Определение клеток с активным транспортом электронов осуществляли в летний период. Среди обработанных проб воды содержание в бактериопланктоне клеток с активным транспортом электронов распределялось следующим образом. В наиболее загрязненном пруду № 2 процент этих клеток составлял 9,6–14,3, в пруду № 3 — 9,2, в «опытных» и «контрольном» рыбоводных прудах соответственно — 3,7–9,4 и 10,8, в р. Рось — 16,4% численности бактериопланктона.

Данные, полученные при изучения метаболически активных клеток бактериопланктона исследованных прудов различными методами *in situ*, показали, что порядок значений, как и разброс данных, характерен для многих водных экосистем.

Выводы

Результаты изучения цитохимическими методами метаболически активных клеток в бактериопланктоне свидетельствуют об относительно невысоком содержании в нем последних. Это совпадает с данными литературы, которые утверждают, что в природной воде менее 20% бактерий являются строго метаболически активными (то есть клетки активнорысающие, с неповрежденной цитоплазматической мембраной, содержащие нуклеоид), хотя их количество может увеличиваться при поступлении в воду питательных веществ, изменении температуры, в результате пресса простейших и т.п. [8, 9]. Это связано с тем, что при формировании условий (назовем их «оптимальными»), отличных от условий *in situ*, «бездействующие» (неактивные, спящие) клетки бактерий становились активными.

1. *Динаміка гідрохімічного режиму каскаду водойм дендропарку «Олександрія» (м. Біла Церква) при надходженні неорганічних форм азоту з джерельними водами* / Ю. Г. Крот, Т. Я. Кирзій, Г. Б. Бабіч [та ін.] // *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія.* – 2005. – Т. 25, № 1-2. – С. 102–109.
2. *Головлев Е. Л.* Другое состояние неспорулирующих бактерий (обзор) / Е. Л. Головлев // *Микробиология.* – 1998. – Т. 67, № 6. – С. 725–735.
3. *Копылов А. И.* Характеристика различных биотопов Рыбинского водохранилища по общей численности и количеству бактерий, содержащих нуклеоиды / А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов // *Микробиология.* – 1998. – Т. 67, № 6. – С. 859–864.
4. *Косолапов Д. Б.* Определение содержания активных клеток в бактериопланктоне Рыбинского водохранилища с помощью 5-циано-2,3-дитолилтетразолия: сравнение с другими методами / Д. Б. Косолапов, А. И. Копылов // *Микробиология.* – 2001. – Т. 70, № 5. – С. 687–693.
5. *Choi J. W.* Dead or alive? A large fraction of ETS-inactive marine bacterioplankton cells, as assessed by reduction of CTC, can become ETS-active with incubation and substrate addition / J. W. Choi, B. F. Sherr, E. V. Sherr // *Aquatic Microbiol. Ecol.* – 1999. – Vol. 18. – P. 105–115.

6. *Choi J. W.* Relation between presence-absence of a visible nucleoid and metabolic activity in bacterioplankton cells / J. W. Choi, E. B. Sherr, B. F. Sherr // *Limnol. Oceanogr.* – 1996. – Vol. 41, № 6. – P. 1161–1168.
7. *Hobbie J. E.* Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy / J. E. Hobbie, R. J. Daley, S. Jasper // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1977. – Vol. 33, № 3. – P. 1225–1228.
8. *Metabolically active bacteria in Lake Kinneret* / T. Berman, B. Kaplan, S. Chava [et al.] // *Aquatic Microbiol. Ecol.* – 2001. – Vol. 23. – P. 213–224.
9. *Methods in microbiology* / Ed. J. H. Paul. – USA: Academic Press, 2001. – Vol. 30. – 657 p.
10. *Porter K. G.* The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora / K. G. Porter, Y. S. Feig // *Limnol. Oceanogr.* – 1980. – Vol. 25, № 5. – P. 943–948.
11. *Świątecki A.* Zastosowanie wskaźników bakteriologicznych w ocenie jakości wód powierzchniowych / A. Świątecki. – Olsztyn : Wyższa szkoła pedagogiczna, 1997. – 106 s.
12. *Zweifel U. L.* Total count of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts) / U. L. Zweifel, A. Hagström // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 65. – P. 2180–2185.

Є.В. Старосила, Г.М. Олійник

Інститут гідробіології НАН України, Київ

МЕТАБОЛІЧНО АКТИВНІ КЛІТИНИ БАКТЕРІОПЛАНКТОНУ, ВИЗНАЧЕНІ *in situ* МЕТОДАМИ

Досліджено метаболічну активність бактеріопланктону водойм дендропарку “Олександрія” (м. Біла Церква) та рибних ставів Білоцерківської гідробіологічної експериментальної станції Інституту гідробіології НАН України. Встановлено частку клітин, які містять нуклеоїд та репліковану ДНК (готові до поділу), а також клітин з неушкодженою цитоплазматичною мембраною (живих) і бактерій з активним транспортом електронів. Встановлено, що концентрація мінерального азоту близько 1 г N/дм³ спричиняє ушкодження цитоплазматичної мембрани клітин бактеріопланктону.

Ключові слова: клітини з нуклеоїдом, клітини з реплікованим нуклеоїдом, стан цитоплазматичної мембрани бактерій, бактерії з активним транспортом електронів.

Iev.V. Starosyla, G.N. Olejnik

Institute of Hydrobiology of NAS of Ukraine, Kyiv

METABOLIC ACTIVE CELLS BACTERIOPLANKTON, DEFINED BY *IN SITU* METHODS

Metabolic activity bacterioplankton of ponds cascade of dendropark "Alexandria" (Bila Tserkva) and fish-breeding ponds system is carried out. It is established percent of cages which nucleoid-visible cells and cells of replication DNA (ready to division), and also cages with intact cell membranes (live) and bacteria with ETS-active (active electron transport system) cells. It is defined, that concentration of mineral nitrogen nearby 1 g N/l causes damage to cells membrane integrity of bacterioplankton

Keywords: nucleoid-visible cells, cells of replication DNA, intact cell membranes, with ETS-active cells

Рекомендує до друку

В.В. Грубінко

Надійшла 16.02.2011